

日 本 国 特 許 庁

08.10.99

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 26 NOV 1999

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1998年10月 9日

出 願 番 号
Application Number:

平成10年特許願第301745号

出 願 人
Applicant(s):

三井製糖株式会社
エーザイ株式会社

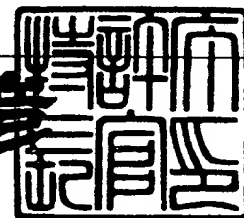
09/806925

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年11月12日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特平11-3078018

【書類名】 特許願

【整理番号】 MST982

【提出日】 平成10年10月 9日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明の名称】 感染防御剤

【請求項の数】 5

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市神奈川区羽沢町 1 1 9 4 - 3 3

【氏名】 水谷 武雄

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県鎌倉市台 4 - 1 2 - 9 - 2 0 1

【氏名】 古家 健二

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県茅ヶ崎市円蔵 1 - 5 - 4 4

【氏名】 永井 幸枝

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県鎌倉市小袋谷 2 - 5 - 1 三井製糖大船寮 3 0
5

【氏名】 村上 博司

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県鎌倉市小袋谷 2 - 5 - 1 三井製糖大船寮 3 0
4

【氏名】 河合 俊和

【特許出願人】

【識別番号】 000174998

【氏名又は名称】 三井製糖株式会社

【代理人】

【識別番号】 100085545

【弁理士】

【氏名又は名称】 松井 光夫

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 014616

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9801908

【書類名】 明細書

【発明の名称】 感染防御剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 甘蔗由来のエキスを有効成分とする感染防御剤。

【請求項 2】 甘蔗由来のエキスが、甘蔗抽出物および甘蔗由来の糖蜜より選ばれる原料を、固定担体を用いたカラムクロマトグラフィーで処理することにより得られる画分である請求項 1 記載の感染防御剤。

【請求項 3】 甘蔗由来のエキスが、甘蔗抽出物および甘蔗由来の糖蜜より選ばれる原料を、固定担体としての合成吸着剤を充填したカラムに通液し、該合成吸着剤に吸着された成分を、水、メタノール、エタノール及びこれらの混合物から選ばれる溶媒で溶出することにより得られる画分である請求項 1 記載の感染防御剤。

【請求項 4】 請求項 1～3 のいずれか一項記載の感染防御剤を含む食品。

【請求項 5】 請求項 1～3 のいずれか一項記載の感染防御剤を含む飼料。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ヒト又は動物のための感染防御剤に関する。

本発明はまた、ヒト又は動物の免疫機能を賦活させ、感染を防御する食品または飼料に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、免疫学の進歩により、ヒト及び動物の種々の疾患あるいは感染症の多くは、免疫機能の低下乃至は免疫機能の不全が原因と考えられるようになっている。

【0003】

例えばヒトの場合、気管支喘息、アレルギー疾患、関節リウマチ、自己免疫疾患、栄養障害、外科手術、高齢化、癌、臓器移植、妊娠等により多くの場合免疫機能が低下乃至は不全になり、呼吸器感染症、敗血症、尿路感染症等の感染症を

併発する。従来、このような疾患や感染症に関しては各種抗生物質が投与されている。しかしながら、抗生物質は継続的に投与すると、耐性菌の発生により特定の抗生物質の効力が減弱して、最近クローズアップされている院内感染の問題も起きている。このようなことから抗生物質のみに依存するのではなく、その使用量を減らし、免疫機能そのものを高めることにより感染の予防・治療を行う薬品もしくは食品の開発が望まれている。

【0004】

一方、畜水産業界においては、家畜、家禽又は養殖魚を効率よく飼育するために、大規模飼育、過密飼育が行われているが、このような飼育形態が原因となるストレスや、幼若期における免疫不全により各種感染症が多発するという問題がある。その対策として病気の治療、予防のための抗生物質の大量投与が採用されている。しかし、抗生物質の大量投与を行うと、今度は抗生物質の残留や耐性菌の増加、耐性菌による病気の発生により、より多くのまたは別の種類の抗生物質を投与する必要があるが出てきている。

【0005】

従来、免疫賦活作用を有し、感染を防御する物質がいくつか探索されている。納豆菌（バチルス・ルブチルス）、バチルス・セレウス、ビフィズス菌、クロストリジウムについてもわずかな免疫賦活作用があることが知られている。また、卵白（特開平3-251573号公報）、卵白、菌及びニンニクの2種以上の組み合わせ（特表平8-509211号公報）、刺梨、ヨモギ及びキャベツより選ばれる1種又は2種以上の組み合わせ（特開平6-116158号公報）、甘草成分（特開平9-143085号公報）の免疫賦活作用または感染防御作用が報告されている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

従来報告されてきた天然の感染防御剤または免疫賦活剤は、効力を示すには高濃度の経口投与が必要であったり、効力を発揮する添加量を食品や飼料に加えるとそれ自体の味、におい、風味が強く、食品や飼料の味やにおいに影響を与えたり、価格が上がるなどの理由で使用範囲が限られていた。従って、広範囲の食品

や飼料に添加可能な味やにおいを有し、わずかな投与量で感染防御作用を示す、安価な天然素材が望まれている。

【0007】

本発明は、ヒト又は動物において安全かつ有効に免疫機能を賦活させることにより各種感染症を防御することができる感染防御剤を提供することを目的とする。

【0008】

本発明はまた、このような感染防御剤を含む食品または飼料を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記の問題点に鑑み、ヒトあるいは動物に安全な、また低コストで製造できる感染防御剤について鋭意検討を重ねてきたが、古来食品として使用されている甘蔗を処理して得られるエキスが、細菌あるいはウイルス等に対する感染防御剤としての効果を発揮することを見出し、本発明を完成した。

【0010】

すなわち本発明は、甘蔗由来のエキスを有効成分とする感染防御剤である。

【0011】

本発明は特に、甘蔗抽出物及び甘蔗由来の糖蜜より選ばれる原料を、固定担体を用いたカラムクロマトグラフィーで処理することにより得られる画分を有効成分とする感染防御剤である。

【0012】

本明細書において、「感染防御剤」とは、免疫賦活効果によって感染防御効果（感染に対する抵抗性を高める効果）を生じる感染防御剤および感染防御効果のみを有する感染防御剤を包含する。

【0013】

本発明において、動物とはヒト以外の脊椎動物を意味し、哺乳類、鳥類および魚類を含む。例えばウシ、ブタ、ウマ等の家畜、ニワトリ、ウズラ等の家禽、ハマチ、タイ、ウナギ、マス、コイ、金魚等の魚類、イヌ、ネコ等のペットが挙げ

られる。

【0014】

本発明において、甘蔗由来のエキスとは、甘蔗を原料として得られたエキスであり、好ましくは、甘蔗抽出物および甘蔗由来の糖蜜より選ばれた原料を固定担体を用いたカラムクロマトグラフィーで処理して得られる画分である。

【0015】

ここで、甘蔗抽出物とは、甘蔗（サトウキビ）を圧搾して得られる圧搾汁、甘蔗を水で浸出して得られる浸出汁、又は原糖製造工場における石灰処理した清浄汁、濃縮汁、精製糖製造工場における樹脂塔再生液、あるいは甘蔗の植物体全体又は一部を、植物由来の成分抽出法において水又は汎用の有機溶媒で抽出した抽出液を意味する。そのような抽出溶媒としては、例えばメタノールやエタノール等のアルコール類、アセトン等のケトン類、酢酸メチルや酢酸エチル等の酢酸エステル類が挙げられ、これらを単独でも組み合わせて使用しても良い。さらに、これらの溶媒を水と組み合わせて使用しても良い。

【0016】

また甘蔗由来の糖蜜とは、例えば、原糖製造工場における製糖廃蜜、精製糖製造工場における洗糖蜜、ブラウンリカー、精糖廃蜜等が挙げられる。

【0017】

本発明の感染防御剤の有効成分である上記エキスは、さらに好ましくは、甘蔗抽出物および甘蔗由来の糖蜜より選ばれた原料を、固定担体としての合成吸着剤を充填されたカラムに通液し、該合成吸着剤に吸着された成分を、水、メタノール、エタノール及びこれらの混合物から選ばれる溶媒で溶出することによって得られる画分である。

【0018】

このようなエキスは、具体的にはたとえば次のようにカラムクロマトグラフィー処理して得ることができる。

【0019】

すなわち、まず甘蔗抽出物又は糖蜜を、固定担体を用いたカラムに通液する。上記甘蔗抽出物又は糖蜜は、そのまま、又は水で任意の濃度の調整して、固定担

体を充填したカラムに通液することができる。なお異物除去のために、カラムで処理する前に、甘蔗抽出物又は糖蜜をろ過することが望ましい。ろ過の手法は特に限定されず、食品工業で広く使用されているスクリーンろ過、ケイソウ土ろ過、精密ろ過、限外ろ過等の手段を好ましく使用できる。

【0020】

固定担体としては、合成吸着剤が好ましい。合成吸着剤としては、好ましくは有機系樹脂を用いることができ、例えば、芳香族系樹脂、アクリル酸系メタクリル樹脂、アクリロニトリル脂肪族系樹脂等が使用できる。さらに好ましくは芳香族系樹脂であり、特に無置換基型の芳香族系樹脂が使用できる。合成吸着剤として、例えばスチレンージビニルベンゼン系樹脂の芳香族系樹脂などが使用でき、芳香族系樹脂としては、例えば疎水性置換基を有する芳香族系樹脂、無置換基型の芳香族系樹脂、無置換基型に特殊処理を施した芳香族系樹脂等の多孔性樹脂が使用できる。より好ましくは無置換基型に特殊処理を施した芳香族系樹脂が使用できる。そのような合成吸着剤は市販されており、例えばダイアイオン（商標）系としてHP-10、HP-20、HP-21、HP-30、HP-40、HP-50（以上、無置換基型の芳香族系樹脂、いずれも商品名、三菱化学株式会社製）；SP-825、SP-800、SP-850、SP-875、SP-70、SP-700（以上、無置換基型に特殊処理を施した芳香族系樹脂、いずれも商品名、三菱化学株式会社製）；SP-900（芳香族系樹脂、商品名、三菱化学株式会社製）；アンバーライト（商標）として、XAD-2、XAD-4、XAD-16、XAD-2000（以上、芳香族系樹脂、いずれも商品名、株式会社オルガノ製）；ダイアイオン（商標）系として、SP-205、SP-206、SP-207（以上、疎水性置換基を有する芳香族系樹脂、いずれも商品名、三菱化学株式会社製）；HP-2MG、EX-0021（以上、疎水性置換基を有する芳香族系樹脂、いずれも商品名、三菱化学株式会社製）；アンバーライト（商標）系として、XAD-7、XAD-8（以上、アクリル酸系エステル樹脂、いずれも商品名、株式会社オルガノ製）；ダイアイオン（商標）系として、HP1MG、HP2MG（以上、アクリル酸系メタクリル樹脂、いずれも商品名、三菱化学株式会社製）；セファデックス（商標）系としてLH20、LH60（

以上、架橋デキストランの誘導体、いずれも商品名、ファルマシア バイオテック株式会社製)などが挙げられる。中でも、SP-850が特に好ましい。

【0021】

固定化担体の量は、カラムの大きさ、溶媒の種類、固定担体の種類などによって変化する。原料(甘蔗抽出物及び糖蜜から選ばれる)の固形分に対して、0.01~5倍湿潤体積量が好ましい。

【0022】

原料(甘蔗抽出物及び糖蜜から選ばれる)を上記カラムに通すことにより、原料中の感染防御活性を有する成分は固定担体に吸着され、蔗糖、グルコース、フラクトースおよび無機塩類の大部分がそのまま流出する。

【0023】

固定担体に吸着された成分は、溶媒により溶出する。ここで、感染防御活性を有する成分を効率よく溶出するには、その前に残留する蔗糖、グルコース、フラクトースおよび無機塩類を水洗により充分に洗い流すことが好ましい。これにより、吸着されている目的とする感染防御活性を有する成分をより効率よく回収することができる。溶出溶媒は、水、メタノール、エタノール及びこれらの混合物から選ばれる。溶出溶媒は水とアルコールの混合溶媒、特にエタノール-水混合溶媒が好ましく、更に、室温において効率よく目的とする感染防御活性を有する成分を溶出できるので、50/50~60/40(体積/体積)エタノール-水混合溶媒が好ましい。更に、カラム温度を上げることにより、エタノール-水混合溶媒のエタノール混合比を減らすことができ、目的とする感染防御効果を有する成分を溶出することができる。この場合、カラム内は常圧もしくは加圧された状態である。このように、感染防御活性を有する成分は、前記溶媒で溶出される画分に存在する。溶出速度はカラムの大きさ、溶媒の種類、固定担体の種類等によって変化するので特に限定されないが、 $SV=0.1\sim10$ が好ましい。なお、 SV (Space Velocity、空間速度)は、1時間あたり樹脂容積の何倍量の液体を通液するかという単位である。

【0024】

前記感染防御活性を有する成分は、これに限定されるものではないが、好まし

くは次のようにして得ることができる。すなわち、原料の固形分に対して0.01～5倍湿潤体積量の無置換基型の芳香族系樹脂を充填したカラムに、カラム温度60～97℃にて原料を通液した後、カラム内を水洗し、次いでカラムに吸着されている成分を、カラム温度20～40℃にて50/50～60/40（体積/体積）エタノール-水混合溶媒で溶出させ、エタノール-水混合溶媒での溶出開始時点から集めた溶出液の量が前記樹脂の4倍湿潤体積量以内に溶出する画分を回収する。

【0025】

かくして回収された画分を集め、慣用の手段（減圧下での溶媒除去、凍結乾燥など）により濃縮して、感染防御活性を有する成分を得ることができる。このようにして得られた感染防御活性を有する成分は、固形分60%以上に濃縮した液状又は粉末状で保存することができる。保存は、特に液状の場合、冷蔵保存が好ましい。

【0026】

本発明で使用する甘蔗由来のエキスは、細菌やウイルス等の病原体に直接作用させたインビトロ試験の場合、抗菌、抗ウイルスに関する高い効果は認められなかった（後述の試験例2および3）。一方、マウスを用いた甘蔗由来のエキスの経口投与による動物実験の結果、インビトロ試験よりも遥かに低い投与量（体重当たりの濃度）で細菌、ウイルスに対する感染防御効果を示した（後述の実施例1および2）。通常の抗菌剤、抗ウイルス剤においては、病原体に試験物質が直接接することができるインビトロ試験より、病原体に試験物質が直接接しにくい動物実験の結果の方が低い活性を示すが、本発明における甘蔗由来のエキスは動物実験の方が遥かに高い感染防御効果を示したことから、本発明における甘蔗由来のエキスは細胞性免疫の機能を高めることにより感染防御作用を示すと考えられる。

【0027】

従って本発明は、ヒトあるいは動物などの免疫機能を高めることにより、各種の免疫機能低下乃至は不全による疾患の予防、治療のために使用できる。または、各種感染症に対する予防、治療のために使用できる。このような疾患は特に特

定されるものではないが、例えばヒトの場合、関節リウマチ、自己免疫疾患、気管支喘息、栄養障害、外科手術、加齢疾患あるいは呼吸器感染症、敗血症、尿路感染症等の各種感染症をあげることができる。また、動物の場合、例えば、ブタの下痢、流行性肺炎、萎縮性鼻炎、伝染性胃腸炎等、ニワトリの肺炎、マレック病、ウシの下痢、肺炎、乳房炎、ペットのエイズ及び白血病などを挙げることができる。さらに、本発明の適用される養殖魚の感染症も特定されないが、例えば、連鎖球菌、類結節症等の細菌感染症、ウイルス感染症等広範である。

【0028】

本発明の感染防御剤の投与量は、甘蔗由来のエキスの精製度、形態、対象とする動物の種類、健康状態、成長の度合い等によって異なるので特に限定されないが、例えば後述の製造例1または2で得た甘蔗由来のエキシ粉末の場合には、体重1kg当たり1日に10~2000mg、好ましくは1日に50~1000mgである。

【0029】

本発明の感染防御剤の投与形態は特に限定されないが、例えば経口的に投与することにより、感染防御効果を発揮する。

【0030】

本発明の感染防御剤を投与する場合の形状は特に限定されず、例えば錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、シロップ剤等の製剤とすることができる。製剤とする場合、慣用の賦形剤、結合剤、滑沢剤等を使用することができる。

【0031】

本発明の感染防御剤は、医薬品としてそのまま投与する、健康食品や嗜好品などの食品（ヒト場合）に含有させて投与する、飼料（動物の場合）に含有させて投与する、または飼料を給餌時にその場で混合して投与することができる。

【0032】

本発明はまた、前記感染防御剤を含む食品および飼料を提供する。食品および飼料は固体でも液体でもよい。食品としては、たとえば菓子類、清涼飲料、機能性調味料、健康食品等が挙げられる。飼料としては、たとえばドッグフード、キャットフードなどのペット用飼料、家畜用飼料、養殖魚介類用飼料等が挙げられる。

【0033】

【実施例】

以下、実施例を挙げて本発明を具体的に解説する。実施例で使用する物質の投与量に関する記載、例えば「10mg/kg」または「10mg/kg体重」は、体重1kg当たり10mgを投与したという意味である。

【0034】

製造例1

原糖製造工場の製造工程にて得られた甘蔗の圧搾汁（固形分18.8%）650リットルを、ジュースヒーターで80℃に加温し、管型限外ろ過（MH-25型、有効膜面積 $2\text{m}^2 \times 3$ 本、分画分子量10万、ダイセル化学工業株式会社製）でろ過処理して、約600リットルの処理液を得た。

【0035】

合成吸着剤SP-850（商品名、三菱化学株式会社）15リットルを、ウォータージャケット付きのカラム（カラムサイズ：内径17.0cm、高さ100cm）に充填し、これに前記の圧搾汁ろ過処理液を、流速30リットル/時間（ $SV=2$ ）の速度で通液した。なお、圧搾汁ろ過処理液通液中は、ウォータージャケットには、65℃の水を常に循環させた。次に、45リットルのイオン交換水を、流速30リットル/時間（ $SV=2$ ）でカラムに通液して洗浄した。イオン交換水で洗浄後、カラムから溶出した画分について糖類の検出を行ったところ、ハンドレフブリックス（Bx）計（アタゴ（株）製、N-1E型）において、Bxが約0になっているのを確認した。その後、溶出溶媒として55%エタノール水溶液（エタノール/水=55/45（体積/体積））を流速30リットル/時間（ $SV=2$ ）にてカラムに通液して、合成吸着剤に吸着した成分を溶出させた。なお、溶出溶媒通過中は、ウォータージャケットには、25℃の水を常に循環させた。カラム溶出液は5リットルずつ分取した。溶出パターンを図1に示す

（①：圧搾汁ろ過処理液の通液開始時点、②：イオン交換水での洗浄開始時点、③：55%エタノール水溶液での溶出開始時点）。55%エタノール水溶液でカラムから溶出した画分（図1においてAの部分）を、濃縮機にて約20倍程度に減圧濃縮した後、1晩凍結乾燥して、茶色の粉末（甘蔗由来のエキス）460g

を得た。

【0036】

製造例2

原糖製造工場の製造工程にて得られた清浄汁（固形分11.7%）600リットルをそのまま限外ろ過処理せずに使用した以外は製造例1と同様にして、カラム処理を行った。このときの溶出パターンを図2に示す（①：圧搾汁ろ過処理液の通液開始時点、②：イオン交換水での洗浄開始時点、③：55%エタノール水溶液での溶出開始時点）。図2において、Bの画分を分取し、減圧濃縮した後、1晩凍結乾燥して、225gの茶褐色の粉末（甘蔗由来のエキス）を得た。

【0037】

試験例1 甘蔗由来のエキスの急性毒性試験

製造例1で得られたエキス粉末を使用して、ラットを用いた単回経口投与毒性試験（平成9年5月27日から6月27日の期間）を行った。Sprague-Dawley系SPFラット（Crj：CD（SD））の雌雄各16匹を5週令で入手し、約1週間検疫・馴化飼育した後、健康な動物を選び、6週令で試験に供した。投与時の体重範囲は雄で157～171g、雌で123～133gであった。

【0038】

飼育条件は、動物は温度 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $50 \pm 2\%$ 、換気回数1時間10～15回、照明1日12時間の飼育室で固形飼料（CRF-1：オリエンタル酵母株式会社）及び飲料水を自由に摂取させて飼育した。

【0039】

投与前一晩（約16時間）絶食させたラットに、一定の投与容量10ml/kg体重にて、所定濃度の甘蔗由来のエキス粉末を1回強制経口投与した。対照群の動物には滅菌蒸留水のみを同様に投与した。なお、絶食後の再給餌は投与6時間後に実施した。

【0040】

投与量は、200mg/kg及び1000mg/kgの2容量とし、これに対照群を加えて計3群を使用した。1群の動物数は雌雄共に5匹とした。

【0041】

結果を以下の表 1 に示す。

【表 1】

単回経口投与毒性試験

投与量 (mg/kg)	濃度 (重量/体積%)	投与容量 (ml/kg 体重)	性	個体数	動物番号
0	0	10	雄	5	1001~1005
0	0	10	雌	5	1101~1105
200	2	10	雄	5	2001~2005
200	2	10	雌	5	2101~2105
1000	10	10	雄	5	3001~3005
1000	10	10	雌	5	3101~3105

【0042】

投与後14日間が経過した後、雌雄とも最大量の1000mg/kgでも、ラットの死亡は認められなかったので、致死量は1000mg/kgを上回るものと推定される。

【0043】

飼育中いずれのラットにおいても異常は認められず、さらに各被検液投与群の雌雄の体重は、対照群とほぼ同等の推移を示し、観察期間中の体重増加も対照群とほぼ同等であった。また、いずれのラットにおいても、体外表、頭部、胸部及び腹部の器官・組織に異常は見られなかった。

【0044】

以上の結果から、製造例 1 で得られたエキス粉末をラットに単回経口投与毒性試験を行ったときの毒性は極めて弱いものと考えられる。

【0045】

試験例 2 甘蔗由来のエキスの大腸菌に対する抗菌活性

製造例 1 および 2 で得られたエキス粉末をそれぞれ用いて、大腸菌 (*Escherichia coli*) 6 種に対する最小発育阻止濃度 (MIC $\mu\text{g/ml}$) を、日本化学療法学会法に準拠して実施した。エキスを滅菌蒸留水で溶解・希釈し、100 $\mu\text{g/ml}$ 、300 $\mu\text{g/ml}$ 、1000 $\mu\text{g/ml}$ 、3000 $\mu\text{g/ml}$ 、10000 $\mu\text{g/ml}$ の 5 段階で測定した。その結果、大腸菌 6 種に対する MIC はすべて 10000 $\mu\text{g/ml}$ であり、強い抗菌活性は認められなかった。結果を以下の表 2 に示す。

【0046】

【表 2】

各菌株に対する最小発育阻止濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

菌株名	製造例 1 のエキス	製造例 2 のエキス
<i>Escherichia coli</i> NIHJ	10000	10000
<i>Escherichia coli</i> C-1	10000	10000
<i>Escherichia coli</i> C-2	10000	10000
<i>Escherichia coli</i> C-3	10000	10000
<i>Escherichia coli</i> TK-18A	10000	10000
<i>Escherichia coli</i> E01292	10000	10000

【0047】

また、他の数種の菌株（細菌、酵母、真菌）に関して同様の試験を行った結果、細菌（*Pseudomonas aureofaciens*）、酵母（*Saccharomyces cerevisiae*、*Hansenula anomala*等）、真菌（*Chaetomium globosum*）については、MICが $1000\mu\text{g/ml}$ であり、大腸菌に対するよりも高い抗菌作用が認められた。

【0048】

試験例 3 甘蔗由来のエキスのウイルス増殖抑制試験

製造例 1 および 2 で得られた甘蔗由来のエキス粉末をそれぞれ用いて、コクサッキーウイルス（Coxsackie virus type B6 Schmitt株）及びヘルペスウイルス（Herpes simplex virus type 1 HF株）の増殖抑制能を調べた。

【0049】

まずエキスのヒト胎児肺由来細胞（HEL-R66細胞）に対する細胞毒性を調べた。甘蔗由来のエキスを滅菌蒸留水に溶解し、最終濃度が $125\sim 2000\mu\text{g/ml}$ になるように調製し、培養細胞にかけた。4日間培養し、細胞変性の有無を検鏡して判断した。その結果、表3に示すように、 $1000\mu\text{g/ml}$ までの濃度では、細胞に対する毒性は認められなかった。

【0050】

次に、細胞に100PFUのウイルスを接種し、ウイルスの吸着後これを除去した。

細胞の維持培地に甘蔗由来のエキスが最終濃度 $125\sim 1000\mu\text{g/ml}$ になるように添加し、ウイルスが吸着した細胞を4日間培養した。培養後、ウイルス増殖の有無を検鏡して判定した。その結果、表4及び表5に示すように、甘蔗由来のエキスは、コクサッキーウイルスに対する増殖抑制効果はもたないが、ヘルペスウイル

スに対し、500～1000 $\mu\text{g/ml}$ の作用濃度で増殖抑制能をもつことが明らかになった。

【0051】

【表3】

	細胞毒性 甘蔗エキスの最終濃度 ($\mu\text{g/ml}$)				
	125	250	500	1000	2000
製造例1のエキス	—	—	—	—	+
製造例2のエキス	—	—	—	—	+
滅菌蒸留水 (対照)	—	—	—	—	—

【0052】

【表4】

コクサッキーウイルスに対する増殖抑制

	甘蔗エキスの最終濃度 ($\mu\text{g/ml}$)		
	125	250	1000
製造例1のエキス	—	—	—
製造例2のエキス	—	—	—
滅菌蒸留水 (対照)	—	—	—

【0053】

【表5】

ヘルペスウイルスに対する増殖抑制

	甘蔗エキスの最終濃度 ($\mu\text{g/ml}$)			
	125	250	500	1000
製造例1のエキス	—	—	±	+
製造例2のエキス	—	—	±	+
滅菌蒸留水 (対照)	—	—	—	—

【0054】

実施例1

SLC: ICRマウス雄5週令(体重約30g)を一群10匹で供試し、菌攻撃1日前に、前記製造例1および2で調製した圧搾汁由来のエキスおよび清浄汁由来

のエキスをそれぞれ滅菌蒸留水で溶解または懸濁したものを、100mg/kg又は500mg/kgになるように強制経口投与した。一方、対照区にも、同容量の滅菌蒸留水を経口投与した。菌攻撃は、ヒト由来大腸菌 (E.Coli) の希釈菌液の1MLDの菌量0.2ml (5.0×10^7 CFU/マウス) を、マウスの皮下に接種し、4日後の生存率を求めた。判定は χ^2 検定により検定し、その結果を表6に示した。

【0055】

【表6】

大腸菌感染防御試験

使用したエキス	エキス摂取量	生存率(%)	χ^2 検定
対照		0	
製造例2のエキス	100mg/kg	30	
製造例2のエキス	500mg/kg	50	*
製造例1のエキス	100mg/kg	50	*

* $p < 0.05$

【0056】

甘蔗由来のエキスを投与後大腸菌を接種した群では、明らかに生存率が上昇しており、また投与量依存的に生存数が上昇した。大腸菌に対する抗菌活性は、経口投与という効率のあまりよくない方法で投与したにもかかわらず、試験例2に示す最小発育阻止濃度より遥かに低い濃度で感染防御効果が認められることから、甘蔗由来のエキスは高い免疫賦活効果を有していると考えられる。

【0057】

実施例2

SLC:ICRマウス雄5週令(体重約30g)を一群10匹で供試し、ウイルス攻撃直後、1日後、2日後の計3回(又は1日3回×3日間連続投与の計9回)のタイミングで、製造例1のエキス(圧搾汁由来の甘蔗エキス)および製造例2のエキス(清浄汁由来の甘蔗エキス)をそれぞれ滅菌蒸留水で溶解または懸濁したものを、表7に示す量で強制経口投与した。一方、対照区にも同容量の滅菌蒸留水を経口投与した。ウイルス攻撃は、ブタ由来オーエスキーウイルスの希釈

ウイルス液の1MLD (133PFU/mouse) のウイルス量0.2mlをマウスの皮下に接種し、7日後の生存率を求めた。判定は χ^2 検定により検定し、その結果を表7に示した。

【0058】

【表7】

ウイルス感染防御試験

使用したエキス	甘蔗由来のエキス摂取量及びタイミング	生存率(%)	χ^2 検定
対照		0	
製造例2のエキス	100mg/kg × 3	10	
製造例2のエキス	200mg/kg × 3	30	
製造例2のエキス	500mg/kg × 3	70	**
製造例1のエキス	100mg/kg × 3	20	
製造例1のエキス	200mg/kg × 3	60	**
製造例1のエキス	500mg/kg × 3	80	**
製造例2のエキス	25mg/kg × 3 × 3	0	
製造例2のエキス	50mg/kg × 3 × 3	30	
製造例2のエキス	100mg/kg × 3 × 3	40	*
製造例2のエキス	200mg/kg × 3 × 3	70	**
製造例2のエキス	500mg/kg × 3 × 3	90	**

* $p < 0.05$

** $p < 0.01$

×3は1日1回3日間連続投与を示し、×3×3は1日3回3日間連続投与を示す。

【0059】

甘蔗由来のエキスを投与した群では明らかに生存率が上昇しており、また投与量依存的に生存数が上昇した。また、試験例3の結果と比較しても、同濃度で明らかに高い感染防御効果を示すことから、甘蔗由来のエキスは感染防御効果を有していると考えられる。

【0060】

【発明の効果】

本発明によれば、甘蔗由来のエキスをヒト又は動物に例えば経口的に与えるこ

とにより、ヒト又は動物の免疫機能を賦活させ、あるいは細菌及びウイルス等による感染を防御することができる。しかも、甘蔗由来のエキ스는植物由来であり、古来、ヒトが黒糖などの含蜜糖として食してきた天然物であるため、ヒト及び動物の健康を害することなく安全で、しかも低コストである。また、天然物であるにもかかわらずその免疫賦活能力は高く、少量で作用するため、産業上非常に有用である。

【0061】

【図面の簡単な説明】

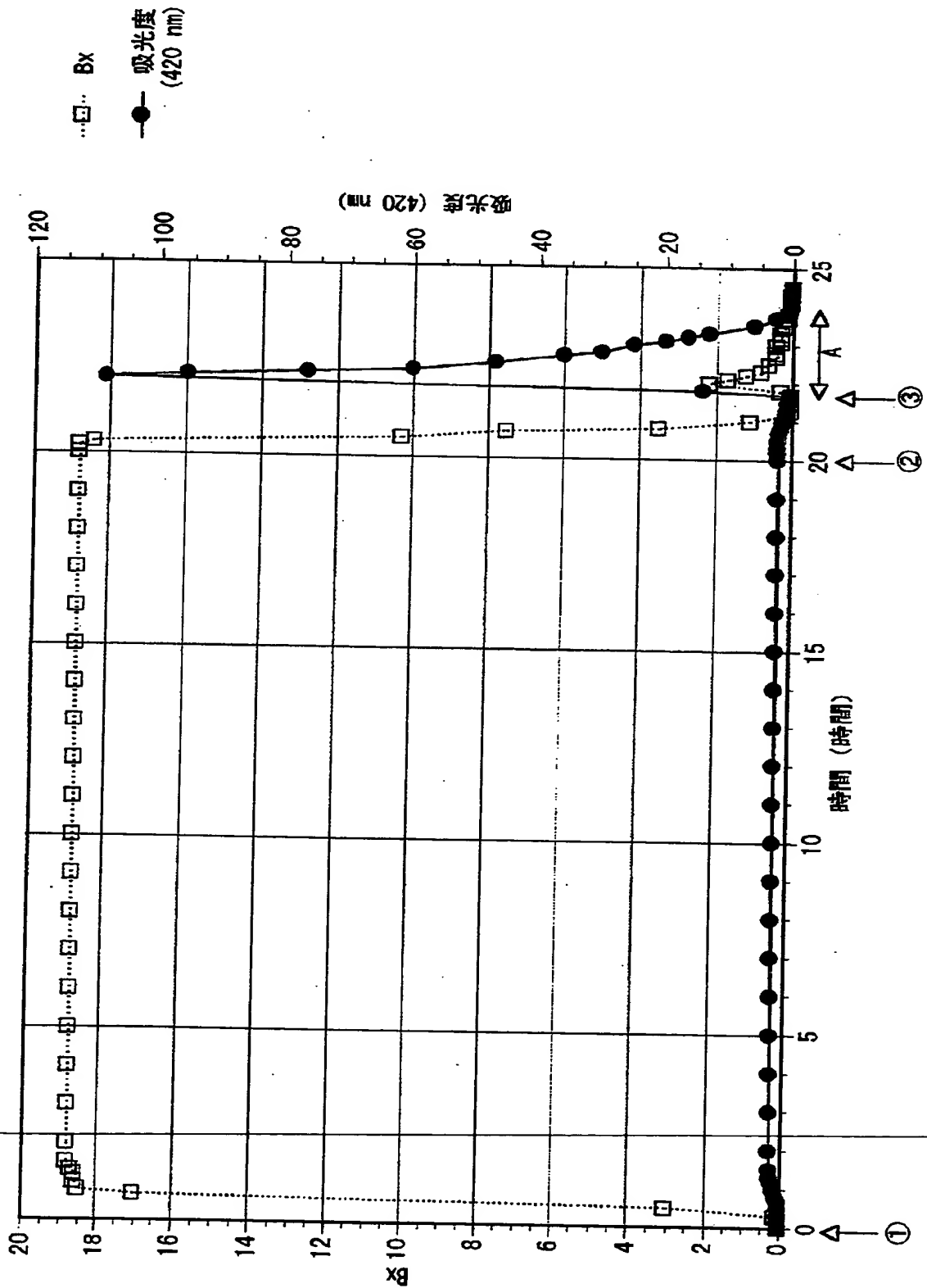
【図1】 製造例1で行ったカラムクロマトグラフィーにおける溶出パターンを示す図である。

【図2】 製造例2で行ったカラムクロマトグラフィーにおける溶出パターンを示す図である。

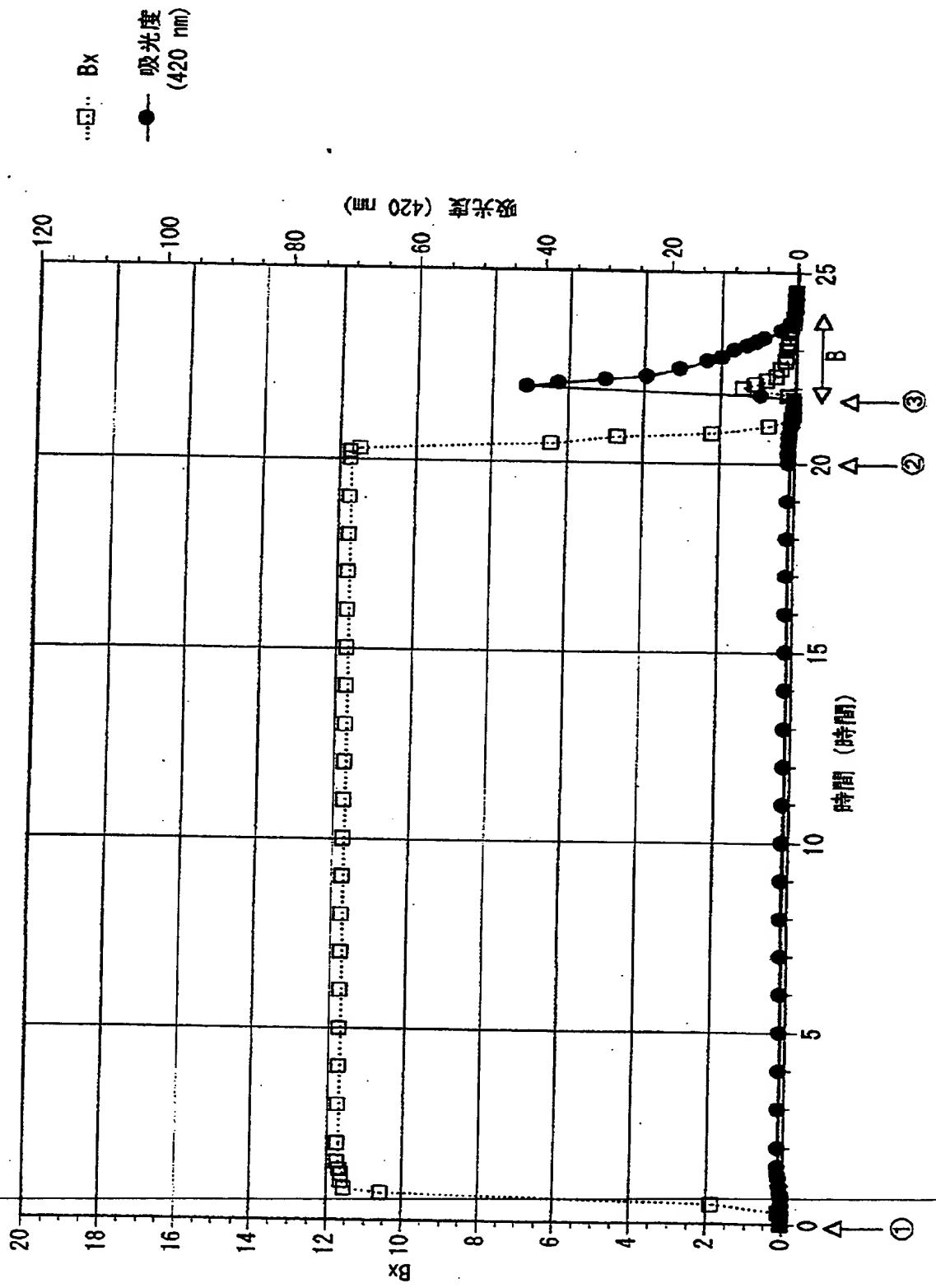
【書類名】

図面

【図1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ヒト又は動物において安全かつ有効に免疫機能を賦活させ、あるいは各種感染症を防御することができる、感染防御剤を提供する。

【解決手段】 甘蔗由来のエキスを有効成分とする感染防御剤。

【選択図】 なし

【書類名】

職権訂正データ

【訂正書類】

特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

000174998

【住所又は居所】

東京都中央区日本橋本町二丁目8番2号

【氏名又は名称】

三井製糖株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】

100085545

【住所又は居所】

東京都港区西新橋2-19-2 西新橋YSビル3

階 松井特許事務所

【氏名又は名称】

松井 光夫

【書類名】 出願人名義変更届
【提出日】 平成11年 2月10日
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
 【出願番号】 平成10年特許願第301745号
【承継人】
 【持分】 001/002
 【識別番号】 000000217
 【氏名又は名称】 エーザイ株式会社
【承継人代理人】
 【識別番号】 100085545
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 松井 光夫
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 014616
 【納付金額】 4,600円

認定・付加情報

特許出願の番号	平成10年 特許願 第301745号
受付番号	59900116190
書類名	出願人名義変更届
担当官	坪 政光 8844
作成日	平成11年 4月13日

<認定情報・付加情報>

【承継人】

【識別番号】

000000217

【住所又は居所】

東京都文京区小石川4丁目6番10号

【氏名又は名称】

エーザイ株式会社

【承継人代理人】

申請人

【識別番号】

100085545

【住所又は居所】

東京都港区西新橋2-19-2 西新橋YSビル

3階 松井特許事務所

【氏名又は名称】

松井 光夫

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000174998]

1. 変更年月日 1994年 5月27日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都中央区日本橋本町二丁目8番2号
氏 名 三井製糖株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000000217]

1. 変更年月日 1990年 8月29日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都文京区小石川4丁目6番10号
氏 名 エーザイ株式会社

